

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

THIS PAGE BLANK (USPTO)

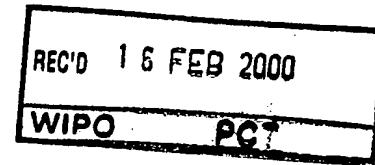
W
09/856723

PCT E 99/03732

BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND

9

D 99/3732



Bescheinigung

Herr Dr. Michael K r a m e r in Pfungstadt/Deutschland hat eine Patentanmeldung unter der Bezeichnung

"Regulatorisches Protein pKe#83 aus humanen Kerstinozyten"

am 26. November 1998 beim Deutschen Patent- und Markenamt eingereicht.

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

Die Anmeldung hat im Deutschen Patent- und Markenamt vorläufig die Symbole C 07 K, A 61 R und C 12 N der Internationalen Patentklassifikation erhalten.

München, den 10. Januar 2000

Deutsches Patent- und Markenamt

Der Präsident
Im Auftrag

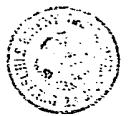
Brand

Aktenzeichen: 198 54 672.6



**PRIORITY
DOCUMENT**

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)



Regulatorisches Protein pK#83 aus humanen Keratinozyten

ZUSAMMENFASSUNG

Die Erfindung betrifft ein isoliertes Polypeptid, das einem natürlicherweise in humanen Keratinozyten vorkommenden und im aktivierte Zustand der Keratinozyten verstärkt exprimierten Protein gleicht oder ähnlich (d.h. in Funktion und Wirkung gleich) ist. Sie betrifft außerdem eine isolierte Nukleinsäure, die ein solches für humane Keratinozyten typisches Polypeptid bzw. Protein kodiert, sowie die Verwendung dieses Polypeptids und dieser Nukleinsäure für nachweisende, insbesondere diagnostische, und/oder für therapeutische Zwecke bzw. die Verwendung von Reagenzien, insbesondere rekombinannten Vektormolekülen und Antikörpern, gegen solche Moleküle. Das erfindungsgemäße Protein weist die im Sequenzprotokoll SEQ ID NO:3 dargestellte Aminosäuresequenz oder ein durch Aminosäuresubstitution, -deletion, -insertion, -oder -inversion daraus entstandenes Allel oder Derivat dieser Aminosäuresequenz auf, und die erfindungsgemäße Nukleinsäure weist entweder die im Sequenzprotokoll SEQ ID NO: 1 dargestellten Nukleotidsequenz oder eine hierzu komplementäre Nukleotidsequenz oder eine Teilesquenz einer dieser beiden Nukleotidsequenzen oder eine ganz oder teilweise mit einer dieser beiden Nukleotidsequenzen hybridisierenden Nukleotidsequenz auf.



Regulatorisches Protein pKe#83 aus humanen Keratinozyten

B e s c h r e i b u n g

5 Die Erfindung betrifft ein isoliertes Polypeptid, das einem natürlicherweise in Keratinozyten vorkommenden und im aktivierte Zustand der Keratinozyten verstärkt exprimierten Protein gleicht oder ähnlich (d.h. in Funktion und Wirkung gleich) ist. Sie betrifft außerdem eine isolierte Nukleinsäure, die ein solches für humane Keratinozyten typisches Polypeptid bzw. Protein kodiert, 10 sowie die Verwendung dieses Polypeptids und dieser Nukleinsäure für nachweisende, insbesondere diagnostische, und/oder für therapeutische Zwecke, und Reagenzien, die unter Verwendung wenigstens eines dieser Moleküle hergestellt sind, insbesondere rekombinante Vektormoleküle und Antikörper.

15

Nach dem gegenwärtigen Stand der Technik werden in der Dermatotherapie zur Beeinflussung epidermaler Störungen wie z.B. der Autoimmundermatosen "Pemphigus vulgaris" und "Bullöses Pemphigoid" im wesentlichen Medikamente mit breitem Wirkungsspektrum eingesetzt, 20 insbesondere lokal bzw. systemisch applizierte Glukokortikoide, Vitamin-A-Säure-Derivate, Antimetabolite und Zytostatika, oder es wird mit mehr oder weniger unspezifischen Maßnahmen wie z.B. der sog. "Farbstofftherapie" oder der "Lichttherapie" behandelt. Die bekannten Wirkstoffe bzw. Maßnahmen haben jedoch allesamt den Nachteil, daß sie wenig spezifisch sind und damit naturgemäß zahlreiche Nebenwirkungen hervorrufen.

25 Die Bereitstellung spezifischer Wirkstoffe scheiterte bislang an dem in der Dermatologie seit langem bestehenden grundsätzlichen Problem, daß die Zahl der zellulären Zielmoleküle, im folgenden allgemein als Zielstrukturen ("Targets") benannt, die als Angriffspunkt für eine (spezifische) Beeinflussung des zellulären Stoffwechsels - insbesondere unter



2

DE 196 33 333

medizinischen oder auch kosmetischen Gesichtspunkten - dienen könnten, in epidermalen Keratinozyten eng begrenzt ist.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es deshalb, neue Zielstrukturen in
5 epidermalen Keratinozyten bereitzustellen, die als Angriffspunkt für Diagnostika, Therapeutika, Kosmetika oder allgemein für die Beeinflussung des zellulären Stoffwechsels dienen können.

Eine Lösung dieser Aufgabe besteht in der Bereitstellung eines Polypeptids
10 bzw. Proteins der eingangs genannten Art, das bei aktivierten Keratinozyten aufreguliert, d.h. vermehrt exprimiert bzw. produziert und auf einem höheren Konzentrationsspiegel gehalten wird, und das die im Sequenzprotokoll
SEQ ID NO: 3 oder SEQ ID NO: 4 dargestellte Aminosäuresequenz oder ein durch Aminosäuresubstitution, -deletion, -insertion oder -inversion daraus
15 entstandenes Allel oder Derivat dieser Aminosäuresequenz aufweist. Das Polypeptid mit der Aminosäuresequenz gemäß **SEQ ID NO: 3** oder **SEQ ID NO: 4** wird im folgenden auch mit Protein "pKe#83" bezeichnet.

Eine weitere Lösung der genannten Aufgabe besteht in der Bereitstellung
20 einer isolierten Nukleinsäure, die ein Protein kodiert, das einem natürlicherweise in humanen Keratinozyten vorkommenden und im aktivierten Zustand der Keratinozyten verstärkt exprimierten Protein gleicht oder ähnlich ist, und die entweder die im Sequenzprotokoll **SEQ ID NO: 1** dargestellte Nukleotidsequenz oder eine hierzu komplementäre
25 Nukleotidsequenz oder eine Teilsequenz einer dieser beiden Nukleotidsequenzen oder eine ganz oder teilweise mit einer dieser beiden Nukleotidsequenzen hybridisierende Nukleotidsequenz aufweist, wobei in diesem Sequenzprotokoll **SEQ ID NO: 1** anstelle von "T" auch "U" stehen kann. Zu dieser erfindungsgemäßen Gruppe von Nukleinsäuren bzw.
30 Nukleotidsequenzen gehören insbesondere auch Splice-Varianten (z.B. **SEQ ID NO: 2**) und Sense- oder Antisense-Oligonukleotide, die mit der im



3

DE 11 1998

Sequenzprotokoll **SEQ ID NO: 1** dargestellten Nukleotidsequenz hybridisieren, vorzugsweise identisch mit bzw. (partiell) komplementär zu dieser sind. Eine bevorzugte Splice-Variante der erfindungsgemäßen Nukleotidsequenz gemäß **SEQ ID NO: 1** ist in dem Sequenzprotokoll

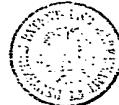
5 **SEQ ID NO: 1** dargestellt.

Die Erfindung umfaßt infolgedessen auch Proteine bzw. Polypeptide der eingangs genannten Art, die eine Aminosäuresequenz aufweisen, welche aus einer solchen Splice-Variante resultiert, insbesondere aus der Splice-
10 Variante einer mRNA, die mit der im Sequenzprotokoll **SEQ ID NO: 1** angegebenen Nukleotidsequenz identisch oder ganz oder teilweise komplementär dazu ist.

15 Die erfindungsgemäßen Sense- und Antisense-Oligonukleotide umfassen jeweils mindestens 6, vorzugsweise 8 - 25 Nukleotide.

Der Begriff "hybridisiert" bezieht sich auf die im Stand der Technik bekannten Hybridisierungsverfahren unter üblichen, insbesondere unter hoch stringenten Hybridisierungsbedingungen. Die konkreten
20 Hybridisierungsparameter wählt der Fachmann anhand der eingesetzten Nukleotidsequenz und seines allgemeinen Fachwissens (vgl.: *Current Protocols in Molecular Biology, Vol. 1, 1997, John Wiley & Sons Inc., Suppl. 37, Chapter 4.9.14*).

25 Neben den in den Sequenzprotokollen **SEQ ID NO:1** und **SEQ ID NO: 2** gezeigten Nukleotidsequenzen und den diesen Sequenzen im Rahmen der Degeneration des genetischen Codes entsprechenden Nukleotidsequenzen umfaßt die vorliegende Erfindung auch solche Nukleotidsequenzen, die damit unter stringenten Bedingungen hybridisieren. Der Begriff
30 "hybridisieren" bzw. "Hybridisierung" gemäß vorliegender Erfindung wird wie bei *Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring*



Harbor, Laboratory Press, 1989, 1.101 bis 1.104 verwendet. Demnach spricht man von einer Hybridisierung unter stringenten Bedingungen, wenn nach Waschen für eine Stunde mit 1 x SSC und 0,1% SDS, vorzugsweise mit niedriger konzentriertem SSC, insbesondere 0,2 x SSC, bei einer

5 *Temperatur von wenigstens 55°C, vorzugsweise 62°C und besonders bevorzugt 68°C noch ein positives Hybridisierungssignal beobachtet wird. Jede Nukleotidsequenz, die unter derartigen Waschbedingungen mit einer Nukleotidsequenz gemäß SEQ ID NO: 1 oder SEQ ID NO: 2 oder mit einer*

10 *der Sequenz gemäß SEQ ID NO: 1 oder SEQ ID NO: 2 im Rahmen der Degeneration des genetischen Codes entsprechenden Nukleotidsequenz hybridisiert, gehört zum Gegenstand der vorliegenden Erfindung.*

Die erfindungsgemäße(n) Nukleinsäure(n) kann (können) sowohl aus einer natürlichen Quelle als auch synthetisch oder halbsynthetisch gewonnen werden. In der Praxis hat sich besonders die Ausführung als cDNA bewährt.

Das Polypeptid, das die Aminosäuresequenz gemäß SEQ ID NO: 3 aufweist und von der im Sequenzprotokoll SEQ ID NO: 1 dargestellten Nukleinsäure kodiert wird, und das im folgenden als Protein "pKe#83" bezeichnet ist, wird 20 in humanen epidermalen Keratinozyten aufreguliert, nämlich verstärkt exprimiert (produziert) und auf einem im Vergleich zum Ausgangszustand signifikant höheren Konzentrationsspiegel gehalten, wenn sich diese Zellen im "aktivierten" Zustand befinden, d.h. unter anderem im Zustand der Proliferation und/oder Migration, z.B. nach einer unfallbedingten 25 Hautverletzung oder bei den autoimmunologisch ausgelösten bullösen Dermatosen "Pemphigus vulgaris" (ausgelöst durch Autoantikörper gegen Desmosomen) und "Bullöses Pemphigoid" (ausgelöst durch Autoantikörper gegen Hemidesmosomen). Der aktivierte Zustand der humanen epidermalen Keratinozyten äußert sich auch in einer im Vergleich zum Ruhezustand 30 (Ausgangszustand) erhöhten Expression der bekannten Aktivierungsmarker uPA (Urokinase-Typ Plasminogenaktivator) und uPA-R (Rezeptor für

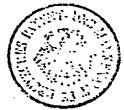
Urokinase-Typ Plasminogenaktivator) und kann anhand dieser Marker qualitativ und quantitativ nachgewiesen werden (vgl.: Schäfer, et al., 1996: *Dispase-mediated basal detachment of cultured keratinocytes induces urokinase-type plasminogen activator (uPA) and its receptor (uPA-R, CD87)*, *Exp. Cell Res.* 228, pp. 246 - 253).

Das Protein pKe#83 weist eine sog. Prenyl-Gruppen-Bindungsstelle ("CAAX Box") auf. Hierbei handelt es sich um eine Bindungsstelle, die bei einer Vielzahl eukaryontischer Proteine eine posttranskriptionelle Veränderung erlaubt, indem eine Farnesyl- oder eine Geranyl-Geranyl-Gruppe an einen Cysteinrest angehängt wird, der drei Aminosäuren vom C-Terminus entfernt ist, und wobei die beiden am C-Terminus gelegenen Aminosäuren in der Regel aliphatisch sind. Ras-Proteine und eine Vielzahl von G-Proteinen weisen eine solche CAAX Box auf.

Zudem besitzt das Protein "pKe#83" eine Reihe putativer Phosphorylierungsstellen. Die genannten Motive weisen darauf hin, daß das Protein pKe#83 in Signaltransduktionsabläufe eingebunden ist.

Mit der (isolierten) Bereitstellung des Proteins "pKe#83", nämlich mit der Beschreibung von Nukleotidsequenzen, die dieses Protein kodieren, und mit der Angabe (einer) seiner Aminosäuresequenz(en) ist es möglich, den Stoffwechsel physiologisch aktiver bzw. aktivierter Keratinozyten - und selbstverständlich auch anderer das Protein "pKe#83" exprimierender Zellen - gezielt zu beeinflussen, insbesondere zu Zwecken der medizinischen Therapie und kosmetischen Behandlung.

Die Erfindung betrifft des Weiteren rekombinante DNS-Vektormoleküle, die eine erfindungsgemäße Nukleinsäure umfassen, und die die Fähigkeit zur Expression eines in humanen Keratinozyten vorkommenden und im aktivierten Zustand der Keratinozyten verstärkt exprimierten Proteins,



6

. 1 . 1 . 1 . 1 .

insbesondere des Proteins pKe#83, in einer prokaryontischen oder eukaryontischen Zelle aufweisen. Bei diesen DNS-Vektormolekülen handelt es sich vorzugsweise um Abkömmlinge des Plasmids pUEX-1 und/oder des Plasmids pGEX-2T und/oder des Plasmids pcDNA3.1, da sich diese Vektoren in der Praxis als sehr gut geeignet erwiesen haben. Besonders bevorzugt sind das Vektorkonstrukt pGEX-2T/pKe#83 gemäß dem in Fig. 2 offenbarten Vektorprotokoll und das Vektorkonstrukt pcDNA3.1/pKe#83-FLAG gemäß dem in Fig. 3 offenbarten Vektorprotokoll. Als eukaryontische Zelle kommen insbesondere Zellen aus Zellkulturen, z.B. Cos-Zellen, in Betracht, ebensogut kann die betreffende Zelle aber auch Bestandteil eines lebenden Organismus, z.B. einer transgenen Maus, sein.

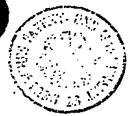
Die Erfindung umfaßt deshalb auch transformierte Wirtszellen, die eine erfindungsgemäße Nukleinsäure enthalten, die mit einem aktivierbaren Promotor gekoppelt ist, der in diesen Zellen natürlicherweise oder als Folge einer Rekombination enthalten ist, und die (infolgedessen) die Fähigkeit zur Expression eines in humanen Keratinozyten vorkommenden und im aktivierte Zustand der Keratinozyten verstärkt exprimierten Proteins, insbesondere des Proteins "pKe#83", besitzen.

20

Die Erfindung betrifft ferner die Verwendung einer erfindungsgemäßen Nukleinsäure oder eines erfindungsgemäßen Vektormoleküls zur Herstellung transgener Säugetiere, insbesondere Mäuse oder Ratten.

25

Die erfindungsgemäßen Transfektanten eröffnen die Möglichkeit für Forschungs- und Entwicklungsarbeiten im Hinblick auf eine weitergehende Aufklärung der durch das Protein "pKe#83" induzierten Veränderungen der Zellmorphologie und zellulären Basisfunktionen wie Proliferation, Adhäsion, Migration und Differenzierung, insbesondere im Hinblick auf die Beantwortung der Frage, ob das Protein "pKe#83" selbst eine "pathogene" Aktivität besitzt.



7

26.11.98

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist außerdem ein Reagenz zum indirekten Nachweis eines in humanen Keratinozyten vorkommenden und im aktivierten Zustand der Keratinozyten verstärkt exprimierten Proteins, insbesondere des Proteins "pKe#83", wobei dieses Reagenz dadurch charakterisiert ist, daß es wenigstens eine erfindungsgemäße Nukleinsäure umfaßt. "Zum indirekten Nachweis" bedeutet in diesem Zusammenhang, daß tatsächlich die das Protein kodierende mRNA direkt nachgewiesen wird - und somit das Protein nur indirekt (vermittels dieser mRNA).

Das Protein "pKe#83" und die damit, d.h. mit der im Sequenzprotokoll **SEQ ID NO: 3** dargestellten Aminosäuresequenz verwandten Polypeptide, d.h. die Polypeptide, die durch Substitution, Deletion, Insertion und/oder Inversion von dieser Aminosäuresequenz gemäß **SEQ ID NO: 3** ableitbar sind oder die eine Aminosäuresequenz aufweisen, die aus einer Splicevariante einer mRNA resultiert, welche mit der Nukleotidsequenz gemäß Sequenzprotokoll **SEQ ID NO:1** oder einer Teilsequenz davon identisch oder komplementär dazu ist oder zumindest hybridisiert, bieten vielfältige Anwendungsmöglichkeiten auf dem Gebiet der dermatologischen Forschung und Entwicklung. Insbesondere können Antikörper gegen diese Polypeptide bzw. Proteine hergestellt werden, die dann mit entsprechender Modifikation entweder als Diagnostika oder als Therapeutika oder auch als Kosmetika ("cosmeceuticals") einsetzbar sind.

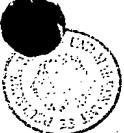
Die Erfindung umfaßt folglich auch die Verwendung eines solchen Proteins bzw. Polypeptids zur Herstellung eines (monoklonalen oder polyklonalen) Antikörpers gegen dieses Polypeptid, den besagten Antikörper selbst und ebenso seine Verwendung zur diagnostischen und/oder therapeutischen Behandlung von dermatologischen Erkrankungen, zur kosmetischen Behandlung der Epidermis und zur Diagnostik und/oder kosmetischen Behandlung von anderen das Protein "pKe#83" exprimierenden Geweben oder Organen.

Auch Sense- und/oder Antisense-Oligonukleotide kommen nach neueren wissenschaftlichen Erkenntnissen als Wirkstoffe für eine Pharmakotherapie in Betracht (vgl. G. Hartmann et al. 1998: *Antisense-Oligonukleotide*, Deutsches Ärzteblatt 95, Heft 24, C1115-C1119) - und überdies als 5 Wirkstoffe mit einem in der Pharmakotherapie grundsätzlich neuen Wirkprinzip.

Die vorliegende Erfindung betrifft deshalb auch die Verwendung erfindungsgemäßer Sense- oder Antisense-Oligonukleotide zur Diagnostik 10 und/oder therapeutischen Behandlung, insbesondere von dermatologischen Erkrankungen, oder zur kosmetischen Behandlung, insbesondere der Epidermis.

Eine technisch und wirtschaftlich bedeutende Einsatzmöglichkeit eines 15 erfindungsgemäßen Polypeptids und ebenso einer erfindungsgemäßen Nukleinsäure besteht nicht zuletzt auch darin, daß mit Hilfe eines solchen Moleküls in einem "Screening"-Verfahren aus einer sehr großen Anzahl bereitstehender Stoffe solche herausselektiert werden können, die spezifisch an die betreffende Nukleinsäure oder das betreffende Polypeptid binden. 20 Diese Stoffe können dann als Ausgangsmaterial (Leitstruktur) für die Entwicklung pharmakologisch einsetzbarer Substanzen dienen und bieten damit die Voraussetzungen für die Entwicklung alternativer Pharmazeutika zur Diagnose und Therapie, insbesondere der eingangs erwähnten dermatologischen Erkrankungen und/oder anderer Erkrankungen, bei denen 25 das Protein "pKe#83" eine wichtige Rolle spielt.

Im Hinblick darauf betrifft die Erfindung auch die Verwendung eines erfindungsgemäßen Polypeptids oder einer erfindungsgemäßen Nukleinsäure zur Identifizierung pharmakologisch einsetzbarer Substanzen, 30 die an das Polypeptid bzw. die Nukleinsäure binden und dadurch dessen



9 100-100

bzw. deren Funktion und/oder Expression beeinflussen, insbesondere inhibierend oder aktivierend wirken.

Die Erfindung wird im folgenden anhand von Herstellungs- und Anwendungsbeispielen näher erläutert. Von den im Rahmen dieser Beispiele erwähnten Figuren zeigen

Fig. 1: einen rt-PCR-Nachweis von "pKe#83"-spezifischer mRNA

Fig. 2: das Vektorkonstrukt pGEX-2T/pKe#83

Fig. 3: das Vektorkonstrukt pcDNA3.1/pKe#83-FLAG

Fig. 4: einen Immunoblot-Nachweis von rekombinantern pKe#83 Protein in E. Coli-Zellen nach Transfektion mit dem Vektorkonstrukt pGEX-2T/pKe#83

Fig. 5: einen Immunoblot-Nachweis von rekombinantern pKe#83 Protein in Cos-Zellen nach Transfektion mit dem Vektorkonstrukt pcDNA3.1/pKe#83-FLAG

Fig. 6: einen Immunoblot-Nachweis von anti-Protein pKe#83-Antikörpern aus Kaninchenserum auf rekombinantern pKe#83-Protein (A) und einen Immunoblot-Nachweis von exprimiertem Protein pKe#83 in transfizierten Cos-Zellen mit anti-Protein-pKe#83-Antikörpern aus Kaninchenserum (B)

Fig. 7: einen "Sandwich"-ELISA -Test unter Verwendung von Antikörpern, die gegen das Protein pKe#83 gerichtet sind.



10

26.11.98

Fig. 8: einen Immunfluoreszenztest unter Verwendung von Kaninchen "anti-pKe#83 IgG" auf Normalhautschnitten (C), NHEK-Sheets direkt nach Dispase-induzierter Ablösung und (A) und NHEK-Sheets 8 Stunden nach Dispase-induzierter Ablösung (B).

5

Fig. 9: Keratinozyten (HaCaT-Zellen) nach Behandlung mit pKe#83-spezifischen Antisense Oligonukleotiden (B) und Kontroll-Oligonukleotiden (A)

10

Beispiel 1: Herstellung des Proteins "pKe#83"

A) Gewinnung und Herstellung eines Polynukleotids, das das Protein "pKe#83" kodiert

Als Polynukleotidquelle dienten humane epidermale Keratinozyten einer Zellkultur bzw. eines Zellkulturmodells, das in der Publikation von Schäfer B.M. et al., 1996: *Dispase-mediated basal detachment of cultured keratinocytes induces urokinase-type plasminogen activator (uPA) and its receptor (uPA-R, CD87)*, *Exp. Cell Res.* 228, pp. 246-253, ausführlich beschrieben ist. Auf den Inhalt dieser Publikation wird hiermit ausdrücklich Bezug genommen. Diese Zellkultur bzw. dieses Zellkulturmodell zeichnet sich dadurch aus, daß sie/es erlaubt, Keratinozyten durch enzymatische Zerstörung der Zell/Matrix-Kontakte, beispielsweise durch eine Dispase-induzierte Ablösung der Keratinozyten von der Kulturmatrixt, vom ruhenden $[uPA/uPA-R]$ in den aktivierte $[uPA^+/uPA-R^+]$ Zustand zu überführen. Die Induktion des aktivierte Zustands ist reversibel: die (erneute) Ausbildung eines konfluenten (= maximal dicht gewachsenen), mehrschichtigen Zellverbands aus differenzierten Keratinozyten führt zur Abregulierung von uPA und uPA-R, d.h. zur Drosselung der Produktion und Einstellung auf

einem niedrigeren Konzentrationsspiegel (siehe dazu die Publikation von Schäfer B.M. et al., 1996: *Differential expression of urokinase-type plasminogen activator (uPA), its receptor (uPA-R), and inhibitor type-2 (PAI-2) during differentiation of keratinocytes in an organotypic coculture system.* 5 *Exp. Cell Res.* 220, pp. 415-423).

Die Zellen dieser Zellkultur bzw. dieses Zellkulturmodells werden im folgenden auch als NHEK (= "normale humane epidermale Keratinozyten") bezeichnet.

10 Für die Bereitstellung der Zellkultur bzw. des Zellkulturmodells wurden folgende Maßnahmen durchgeführt: Mittels Hautbiopsie erhaltene NHEK wurden über Nacht bei 4°C trypsinisiert und anschließend nach der "Feeder Layer"-Technik von J.G. Rheinwald und H. Green (1975, *Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes: the formation of keratinizing colonies from single cells*, *Cell* 6, pp. 331-334) in Petrischalen oder in 15 175 cm² Kulturflaschen für die Dauer von 8 Tagen in Dulbecco's modified Eagle's Medium (DMEM) mit einem Gehalt von 10 Vol.-% fötalem Kälberserum (FCS) und Zusätzen an Adreninhemisulfat, Insulin, Transferrin, 20 Trijodthyronin, Hydrocortison, Forskolin, epidermalem Wachstumsfaktor (EGF) und Antibiotika (Penicillin, Streptomycin und Gentamycin) unter Differenzierungsbedingungen, insbesondere erhöhten Kalziumspiegeln, kultiviert (37°C, 7 % CO₂). Die Kultivierung erfolgte damit gemäß herkömmlicher und im Stand der Technik geläufigen Bedingungen. Unter 25 diesen Bedingungen bilden Keratinozyten konfluente zwei- bis dreischichtige sog. "Epidermisäquivalente" oder Keratinozyten-"Sheets" aus.

30 Diese Epidermisäquivalente bzw. Keratinozytensheets wurden durch eine 30-minütige Behandlung mit Dispase II (2,4 mg/ml in DMEM ohne FCS) von der Kulturmatrix abgelöst, zweimal in DMEM gewaschen und anschließend für die Dauer von 4 - 8 Stunden in komplettem, konditioniertem DMEM.

inkubiert. Die Inkubation in konditioniertem DMEM erfolgte, um den Einfluß von frischem FCS auszuschließen. Während der Inkubation fand in diesen flotierenden Keratinozytensheets eine Aufregulierung der bekannten Aktivierungsmarker uPA und uPA-R sowie des hierin erstmals beschriebenen Proteins pKef#83 statt. Die uPA/uPA-R-Aufregulierung war mittels bekannter Techniken wie Enzyme-Linked-Immunoabsorbent Assay (ELISA), *in situ*-Hybridisierung und Immunfluoreszenz nachweisbar. Aus den inkubierten Zellen wurde mittels der im Stand der Technik bekannten (vgl.: Guanidinium-Thiocyanat-Phenol-Chloroform-Extraktionsmethode *Chromczynski P. and Sacchi N., 1986: Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Anal. Biochem. 162: pp. 156-159*) die gesamte RNA gewonnen (Kit "RNA-Clean" der Firma AGS, Heidelberg). Aus der Gesamt-RNA wurde die mRNA mittels Bindung an Poly-T-beschichtete Kugelchen isoliert. Diese mRNA diente als Ausgangsmaterial für den nächstfolgenden Verfahrensschritt der Subtraktionsklonierung.

Für den Einsatz in Kontrollversuchen bzw. für Vergleichspräparate wurde mRNA von adhärenten Keratinozytensheets isoliert, und zwar nach dem gleichen Verfahrensmuster wie vorstehend beschrieben, ausgenommen der Abweichung, daß für die Dauer der Dispasebehandlung zusätzlich zu der Dispase ein Dispasehemmer, z.B. Phosphoramidon (100 µg/ml), appliziert wurde.

Nach dem Prinzip der Subtraktionsklonierung wurde eine Genbank erstellt, die vorzugsweise cDNA der dyshäsionsinduzierten Gene enthielt, d.h. solcher Gene, die nach Ablösung der Keratinozytensheets vermehrt in diesen (bzw. deren Zellen) exprimiert wurden. Zu diesem Zweck wurde die aus den Zellen der adhärenten Keratinozytensheets gewonnene mRNA erneut an poly-T-beschichtete Kugelchen gebunden, auf diesen in einzelsträngige cDNA umgeschrieben und anschließend gegen die mRNA

abgelöster, d.h. nicht-adhärenter Keratinozytensheets hybridisiert. Diejenigen mRNA-Moleküle, die lediglich im nicht-adhärenten Zustand, d.h. nach Dyshäsion exprimiert wurden und infolgedessen keinen Hybridisierungspartner fanden, verblieben im Überstand. Sie wurden in cDNA umgeschrieben und in den Klonierungsvektor pUEX-1 kloniert.

5

Die daraus resultierende Genbank wurde zwecks Überprüfung anschließend noch einem Southernblot-Verfahren mit [³²P]-markierter cDNA adhärenter und nicht-adhärenter Keratinozytensheets unterworfen. Diejenige cDNA oder 10 vielmehr die sie enthaltenden Wirtszellklone - hier des E.coli Stamms MC1061 -, die nach Dyshäsion eine deutliche Aufregulation zeigten, wurden anschließend über Nacht bei 30°C unter üblichen Kulturbedingungen kultiviert bzw. vermehrt. Aus diesen E.coli-Klonen wurde die Plasmid-DNA (pUEX1-cDNA) herauspräpariert, und die aus dem pUEX1-Vektor 15 herausgeschnittenen cDNA-Fragmente wurden mittels Random-priming [³²P]-markiert. Die markierte cDNA wurde als Sonde in Northernblots mit RNA aus adhärenten und nicht-adhärenten Keratinozytensheets eingesetzt. Die Klone, die cDNA enthielten, die bei Verwendung als Sonde im Northernblot-Verfahren kein oder nur ein geringes Signal mit der RNA 20 nicht-adhärenter Keratinozyten, dagegen ein deutliches Signal mit RNA nicht-adhärenter Keratinozytensheets erkennen ließen, wurden für den nachfolgenden Verfahrensabschnitt der Sequenzierung ausgewählt.

Bei der Sequenzierung der betreffenden Klone mittels des "nicht- 25 radioaktiven Cycle-Sequencing", das eine Modifikation der Sequenzierungsmethode nach Sanger (F. Sanger et al., 1977: *DNA sequencing with chain terminating inhibitors*, *Proc Natl Acad Sci USA* 74: 5463-5467) darstellt und mittlerweile eine dem Stand der Technik geläufige 30 Methode ist, wurde unter anderem das Gen mit der Nukleotidsequenz gemäß Sequenzprotokoll SEQ ID NO: 1 gefunden. Darüberhinaus fand sich die im Protokoll SEQ ID NO: 2 dargestellte Splice-Variante. Das Gen

mit der Nukleotidsequenz gemäß Protokoll **SEQ ID NO: 1** und das zugehörige Protein erhielten die Bezeichnung "pKe#83".

Nähere Untersuchungen der zu dem Gen pKe#83 gehörigen, d.h. pKe#83-spezifischen mRNA (aus abgelösten, d.h. nicht-adhärenen Keratinozytensheets) lieferten die Informationen, daß diese mRNA eine Größe von etwa 2,6 kb aufweist. Die Nukleotidsequenz gemäß **SEQ ID NO:1** enthält am 3'Ende an Position 1651-1653 ein Stopcodon, das den mutmaßlichen Ort des Transkriptionsendes vorgibt. An Position 2612-2617, genau 26 Nukleinsäuren vor der poly-A-Site befindet sich eine sog. Polyadenylation site. Es wurde eine Splice Variante (**SEQ ID No: 2**) gefunden, die um 111 Nukleinsäuren (Position 669-780) kürzer ist. **Fig. 1.C** zeigt das Ergebnis der Klonierung der pKe#83 Gesamt-cDNA-Sequenz, es gilt:

15

Spur 1 = DNA Molekulargewichtsmarker VI
 (154-2176 Bp, Boehringer Mannheim),
 Spur 2 = SEQ ID No: 1 (1570 Bp)
 Spur 3 = SEQ ID No: 2 (1460 Bp).

20

Mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion konnte gezeigt werden, daß die pKe#83-spezifische mRNA nach Dispase-induzierter Ablösung der NHEK eine Aufregulation erfährt. In **Fig. 1.A** ist das Ergebnis einer Polymerasekettenreaktion nach reverser Transkription (rt-PCR) der mRNA in cDNA und Amplifikation mit pKe#83-spezifischen Oligonukleotid-Primern dargestellt. Dieses Ergebnis beinhaltet die Aussage, daß direkt nach der Ablösung der NHEK nur wenig pKe#83-mRNA vorhanden oder jedenfalls nachweisbar war, daß aber bereits 2 Stunden später eine deutliche Aufregulation festgestellt werden konnte.

30



15

30 10 93

B) Ableitung der Aminosäurenabfolge und Charakterisierung des Proteins "pKe#83" anhand des dafür kodierenden Polynukleotids

Anhand des genetischen Codes der "pKe#83"-cDNA wurde mit Hilfe eines computergestützten Verfahrens (Programm "HUSAR" [= Heidelberg Unix Sequence Analysis Ressources] Version 4.0, Deutsches Krebsforschungszentrum Heidelberg, 1997] von der Nukleotidsequenz gemäß Sequenzprotokoll **SEQ ID NO: 1** eine Aminosäuresequenz abgeleitet, die im Sequenzprotokoll **SEQ ID NO: 3** dargestellt ist. Die strukturelle Analyse dieser Aminosäuresequenz gemäß Sequenzprotokoll **SEQ ID NO: 3** mit eben diesem Programm lieferte folgende Informationen:

Aus der Aminosäurezusammensetzung des Proteins pKe#83 errechnet sich ein Molekulargewicht von 60380 Da mit einem isoelektrischen Punkt von pH 5,3.

Das Protein pKe#83 weist eine sog. Prenyl-Gruppen-Bindungsstelle ("CAAX Box") auf und eine Reihe möglicher Phosphorylierungsstellen (9x Proteinkinase C, 15x Caseinkinase II, 2x Tyrosinkinase). Diese Motive sind ein Indiz dafür, daß das Protein pKe#83 in Signaltransduktionsabläufe eingebunden ist.

Beispiel 2: Nachweis "pKe#83"-spezifischer mRNA in Zellen mittels reverser Polymerasekettenreaktion

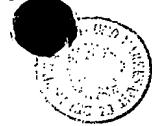
Mittels der Polymerasekettenreaktion nach reverser Transkription (rt-PCR) wurde pKe#83-spezifische mRNA in Zellen (NHEK) von Keratinozytensheets nach Dispasebehandlung und in HaCaT-Zellen nachgewiesen. Hierfür wurde RNA aus Zellen von Keratinozytensheets nach Dispasebehandlung und unterschiedlich langer weiterer Inkubationszeit und aus HaCaT-Zellen

28.11.98

jeweils mit Standardmethoden (Guanidinium-Thiocyanat-Phenol-Chloroform-Extraktionsmethode) isoliert und nach Standardmethoden in cDNA umgeschrieben. Diese cDNA wurde einer PCR unterzogen, bei der aus der pKe#83-spezifischen cDNA ein Teilstück von 388 Bp amplifiziert wurde.

- 5 Als Primer-Paar wurde eine Kombination aus pKe#83-forward-10 ('¹⁰³²GAATAGACCAGAGATGAAAAGGCAG¹⁰⁵⁶') und pKe#83-reverse-17 ('¹⁴¹⁸CGGTTTCAGCAGCTCATACC¹³⁹⁹') eingesetzt. Es wurden 10 ng cDNA mit je 10 µM Primer zusammen mit einem Gemisch aus hitzestabiler DNA-Polymerase, ATP, TTP, GTP, CTP und Polymerasepuffer (vgl. z.B.: *Current Protocols in Molecular Biology*, Vol. 1, 1997, John Wiley & Sons Inc., Suppl. 37, Chapter 15), hier im Beispiel in Form des im Handel gebrauchsfertig erhältlichen "PCR-Master-Mix" der Firma Clontech, in Ansatz gebracht. Zusätzlich wurden folgende Kontrolluntersuchungen durchgeführt: 1. der vorstehend beschriebene Reaktionsansatz mit dem Plasmid pUEX/pKe#83
- 10 15 anstelle der cDNA ("Positivkontrolle"), 2. der vorstehend beschriebene Reaktionsansatz ohne Zusatz von cDNA ("Negativkontrolle"), 3. der vorstehend beschriebene Reaktionsansatz mit GAPDH-spezifischen Primern (#302047, Stratagene; "GAPDH-Kontrolle").
- 20 Die Reaktionsprodukte der PCR-Reaktion wurden im Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Fig. 1.A zeigt das Ergebnis einer pKe#83-spezifischen PCR Auftrennung. Es gilt:

- 25 Spur 1 = DNA Molekulargewichtsmarker VII
(359-8576 Bb, Boehringer Mannheim)
- Spur 2 = HaCaT
- Spur 3 = HMEC (Zelllinie, in der pKe#83 nicht nachweisbar ist)
- Spur 4 = NHEK T0 (direkt nach Ablösung),
- Spur 5 = NHEK T2 (2 h nach Ablösung)
- 30 Spur 6 = NHEK T4 (4 h nach Ablösung)
- Spur 7 = NHEK T8 (8 h nach Ablösung),



Spur 8 = pUEX/pKe#83-Plasmid

Spur 9 = keine cDNA.

Ein PCR-Produkt der erwarteten Größe von ≈ 390 Bp wurde in den Spuren
5 2, 5 - 8 nachgewiesen, d.h. pKe#83-spezifische mRNA wurde in den
Keratinozytensheets (NHEK) zu den Zeitpunkten 2, 4 und 8 Stunden nach
Dispase-induzierter Ablösung und ebenso in HaCaT-Zellen nachgewiesen.

10 Fig. 1.B zeigt das Ergebnis einer GAPDH-spezifischen PCR. Es gilt:

Spur 1 = DNA Molekulargewichtsmarker VII
(359-8576 Bb, Boehringer Mannheim)

Spur 2 = HaCaT

15 Spur 3 = HMEC

Spur 4 = NHEK T0

Spur 5 = NHEK T2

Spur 6 = NHEK T4

Spur 7 = NHEK T8

20 Diese GAPDH-spezifische PCR ("GAPDH-Kontrolle") beweist, daß ein
negatives PCR Ergebnis im pKe#83-spezifischen Ansatz nicht auf ein
Nichtvorhandensein von cDNA zurückzuführen ist, da in allen
Reaktionsansätzen von T0 - T8 ein PCR-Produkt der erwarteten Größe von
25 600 Bp nachweisbar war.

Die rt-PCR ermöglicht den Nachweis der pKe#83-Expression auch in Fällen,
in denen der Nachweis des pKe#83-Proteins aufgrund zu niedrigen
Expressionsspiegels mit immunhistologischen Methoden, dem ELISA oder
30 mit Immunoblot-Verfahren nicht gelingt.

26.11.98

Beispiel 3: Herstellung von Vektormolekülen mit der Fähigkeit zur Expression des Protein pKe#83 in prokaryontischen bzw. eukaryontischen Zellen, sowie Produktion und Reinigung des rekombinanten pKe#83 Proteins

5

Zur Herstellung bzw. Expression des rekombinanten pKe#83-Proteins wurden zwei Wege beschritten. Zum einen wurde das Vektorkonstrukt pGEX-2T/pKe#83 gemäß Vektorprotokoll in **Fig. 2** für die Expression in Bakterien (*E.coli* DH5 α) hergestellt. Zum anderen wurde das **10** Vektorkonstrukt pcDNA3.1/ pKe#83-FLAG gemäß Vektorprotokoll in **Fig. 3**) zum Zweck der Expression in eukaryontischen Zellen (Cos-Zellen) hergestellt.

15 Das Vektorkonstrukt pGEX-2T/pKe#83 wurde nach Standardprotokollen für die Transformation von *E.coli* DH5 α eingesetzt. Das pKe#83-Glutathion-S-Transferase-(GST)-Fusionsprotein wurde in den Bakterien exprimiert, das bakterielle Lysat wurde im Immunoblot mit anti-GST-Antikörpern untersucht, und zwar im Vergleich zu Lysat von Bakterien, die mit einem Kontrollplasmid (kein GST) transformiert wurden.

20

20 Das pKe#83/GST-Fusionsprotein wurde durch Affinitätschromatographie mit Hilfe von Gluthathion-Sepharose 4B aus den Bakterienlysaten gereinigt. Die Fraktionen dieser Reinigung wurden dann im Immunoblot mit anti-GST-Antikörpern untersucht.

25

25 Das Produkt des Immunoblots ist in **Fig. 4.B** abgebildet, **Fig. 4.A** zeigt die entsprechende Proteinfärbung (Ponceau-Rot) des Blots vor Antikörperfärbung. Es gilt:

30 Spur 1 = Bakterienlysat der Kontrolltransfektante
 Spur 2 = Bakterienlysat der pUEX-2T/pKe#83-GST Transfektante

Spur 3 = Säulendurchlauf
 Spur 4 - 6 = Waschfraktion 1-3
 Spur 7-11 = Elutionsfraktion
 Spur 12 = pKe#83/GST-Fusionsprotein vor Thrombinverdau
 5 Spur 13 = pKe#83/GST-Fusionsprotein nach Thrombinverdau

Das pKe#83/GST-Fusionsproteins hatte ein apparentes Molekulargewicht von ca. 90 kDa. Das erlaubt den Schluß, daß das 90 kDa pKe#83/GST-Fusionsprotein aus dem GST-Protein (ca. 26 kDa) und einem ca. 60 - 65 kDa großen Fragment des Proteins pKe#83 besteht.

10 Im eukaryontischen System wurde der pcDNA3.1/pKe#83-FLAG Vektor (Fig. 3) in sog. Cos-Zellen, d.h. in Zellen der im Stand der Technik allgemein bekannten Cos-Zelllinie, transformiert. Die Zellen wurden nach Standardverfahren durch Behandlung mit DEAE-Dextran/Chloroquin zur Aufnahme der Plasmid-DNA gebracht. Danach wurden die transformierten Zellen drei Tage unter Standardbedingungen (37°C und 7 % CO₂) inkubiert. Die Cos-Zellen wurden lysiert und im Immunoblot unter Verwendung eines Antikörpers gegen das FLAG-Epitop analysiert. Fig. 5 zeigt das Produkt des 15 Immunoblots:

20 Spur 1 = mit pcDNA3.1/pKe#83-FLAG Vektorkonstrukt transfizierte Cos-Zellen entwickelt mit einem isotyp-identischen Kontroll-Antikörper.
 25 Spur 2 = mit dem pcDNA3.1 Vektor (ohne pKe#83) transfizierte Cos-Zellen entwickelt mit einem isotyp-identischen Kontroll-Antikörper.
 Spur 3 = mit pcDNA3.1/pKe#83-FLAG Vektorkonstrukt transfizierte Cos-Zellen entwickelt mit dem anti-FLAG Antikörper.
 30 Spur 4 = mit dem pcDNA3.1 Vektor (ohne pKe#83) transfizierte Cos-Zellen entwickelt mit dem anti-FLAG Antikörper,

Spur 5 = FLAG-markiertes Kontrollprotein das die Funktionalität des anti-FLAG-Antikörpers zeigt.

Das Ergebnis dieses Versuch belegt die Expression des pKe#83-FLAG-Fusionsproteins in Cos-Zellen, die mit dem Vektorkonstrukt pcDNA3.1/pKe#83-FLAG transfiziert wurden.

Beispiel 4: Herstellung und Charakterisierung von Antikörpern gegen das pKe#83 Protein, sowie immunologischer Nachweis des pKe#83 Proteins mittels Immunoblot ("Westernblot"), Immunhistologie und Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Gereinigtes rekombinantes pKe#83-Nichtfusionsprotein wurde für die adjuvantunterstützte Immunisierung von Kaninchen und Mäusen eingesetzt. Die Details des Immunisierungsverfahrens sind im Stand der Technik allgemein geläufig. Die Immunisierung von Kaninchen wurde im Kundenauftrag von der Fa. Dr. J. Pineda Antikörper-Service (Berlin) durchgeführt. Es wurden Seren vor ("Präimmunserum") und nach ("Postimmunserum") Immunisierung gewonnen. Aus den Seren wurde die IgG-Fraktion nach Standardverfahren mittels Ammoniumsulfatfällung isoliert. Die resultierenden IgG-Präparationen werden im folgenden als "anti-pKe#83 IgG" bezeichnet.

Das Kaninchen "anti-pKe#83 IgG" zeigte eine deutliche Immunreaktion mit dem für die Immunisierung verwendeten rekombinanten pKe#83 Protein. Das Produkt dieses Immunblots ist in Fig. 6.A dargestellt. Es gilt:

Spur 1 = Präimmun Kaninchen IgG, 1:10 000 verdünnt,
Spur 2 = anti-pKe#83 IgG 1:50 000 verdünnt



26.11.98

Spur 3 = anti-pKe#83 IgG 1:100 000 verdünnt
 Spur 4 = anti-pKe#83 IgG 1:200 000 verdünnt

Der Pfeil markiert die Position des pKe#83-Proteins.

5

Mit dem polyklonalen Kaninchen "anti-pKe#83 IgG" und polyklonalem Maus "anti-pKe#83 IgG" wurden darüberhinaus Zellysate von pKe#83-transfizierten Cos-Zellen im Immunblotverfahren auf die Expression des Proteins pKe#83 getestet. Das Produkt dieses Immunblots ist in Fig. 6.B dargestellt. Es gilt:

- Spur 1 = Präimmun Kaninchen IgG,
- Spur 2 = Kaninchen "anti-pKe#83 IgG",
- 15 Spur 3 = normal Maus IgG,
- Spur 4 = Maus anti-pKe#83 IgG,
- Spur 5 = anti-FLAG Antikörper.

20 **Immunhistologie:** Mit Hilfe eines Kryotoms wurden 5 µm-dicke Gefrierschnitte von Geweben aus Hautbiopsien von klinisch unauffälliger Normalhaut und von Dispase-abgelösten NHEK-"Sheets" zum Zeitpunkt T0 und T8 hergestellt. Diese wurden bei Raumtemperatur luftgetrocknet und in 100 % Azeton fixiert (anstelle von Azeton kann ebensogut auch 100 % Methanol, 100 % Ethanol oder 4 %-iges Paraformaldehyd verwendet werden). Danach wurden die Schnitte gemäß im Stand der Technik bekannter sog. "Blockierungsverfahren" behandelt, um unspezifische Bindungsstellen für den Antikörper zu blockieren. Im vorliegenden Beispielfall wurden zwei Blockierungsschritte durchgeführt: (1) eine Blockierung mit Avidin/Biotin und (2) eine Blockierung mit Normalserum. Im ersten Blockierungschnitt wurde die Avidin/Biotin-Blockierung unter



00 1 1 00

Verwendung des Avidin/Biotin-Blockierungskits der Firma Vector-Laboratories nach Herstellervorschrift eingesetzt, d.h. es wurde bei Raumtemperatur zunächst 15 Minuten mit der Avidin-Fertiglösung und nachfolgend 15 Minuten mit der mit der Biotin-Fertiglösung inkubiert.

- 5 Anschließend wurden die Schnitte mit 10 Vol-% Normalserum in PBS für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert (Normalserum der Spezies, aus der der Zweitantikörper stammt, hier Ziege-Normalserum, PBS = Phosphate buffered saline = Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung, pH 7,2 - 7,4).
- 10 Im Anschluß an die Blockierung wurden die Schnitte in PBS mit einem Gehalt an 5µg/ml Kaninchen "anti-pKe#83 IgG" für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Zur Entfernung des nichtgebundenen Antikörpers wurden die Schnitte anschließend in PBS mit einem Gehalt an 0,2 % (Gewicht/Volumen) bovinem Serumalbumin gewaschen. Es folgt die
- 15 Inkubation mit einem beispielsweise Biotin-markierten und gegen Kaninchen-IgG-gerichteten Antikörper aus der Ziege (1:500 verdünnt in PBS/ 0,2% BSA; 30 Minuten bei Raumtemperatur), ein weiterer Waschschritt, sowie die Aufbringung eines mit dem Fluoreszenzfarbstoff Cy3-markierten Streptavidins (1 : 1000 in PBS/0,2 % BSA verdünnt). Anstelle von Cy3 kann 20 auch ein anderer Fluoreszenzfarbstoff zur Markierung des Streptavidins verwendet werden, z.B. FITC. Nach einem letzten Waschschritt wurden die Schnitte mit Eideckmedium, z.B. Elvanol oder Histogel, eingedeckt und im Fluoreszenzmikroskop untersucht und ausgewertet.
- 25 In Fig. 8 sind die Ergebnisse eines derart durchgeföhrten Immunfluoreszenztests dargestellt: Das Kaninchen "anti-pKe#83 IgG" zeigt auf Normalhautschnitten eine schwache intrazelluläre und eine starke Zellmembran-assoziierte Immunfärbung (Fig. 8.C). Die NHEK "Sheets" T0 (= direkt nach Dispase-induzierter Ablösung vom Substrat) zeigen nur eine 30 leichte Hintergrundfärbung (Fig. 8.A) während die NHEK "Sheets" T8 (= 8 Stunden nach der Dispase-induzierten Ablösung vom Substrat) eine

deutliche Immunfärbung aufweisen (Fig. 8.B). Dieses Ergebnis beinhaltet die Aussage, daß direkt nach der Ablösung wenig Protein pKe#83 vorhanden oder jedenfalls nachweisbar war, aber 8 Stunden später bereits eine vermehrte Expression stattgefunden hatte und infolgedessen deutlich höhere Mengen Protein pKe#83 nachgewiesen werden konnten.

5 **Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA):** Zur Quantifizierung des pKe#83-Proteins in komplexen Lösungen wurde ein sog. "Sandwich"-ELISA 10 (Fig. 7) durchgeführt. Hierzu wurde eine Mikrotiterplatte mit einem gegen pKe#83 gerichteten Antikörper (z.B. Kaninchen anti-pKe#83 IgG, 1 µg/Vertiefung) beschichtet. Dann wurden die noch verbliebenen unspezifischen Bindungsstellen der Mikrotiterplatte durch Behandlung mit 15 0,1 Gewichts-% Gelatine in phosphatgepufferter Kochsalzlösung ("PBS/Gelatine") blockiert. Anschließend wurde die Mikrotiterplatte mit unterschiedlichen Konzentration des pKe#83-Proteins als Kalibrator, bzw. mit Verdünnungen unbekannter Proben (in denen die pKe#83-Konzentration festgestellt werden sollte) in Ansatz gebracht. Nach einem Waschschritt mit 20 0,05 Volumen-% Tween-20 in PBS (PBS/Tween) wurde die Platte mit einer IgG Präparation aus einer zweiten Spezies (z.B. mit Maus anti-pKe#83 IgG) inkubiert (z.B. eine Stunde unter Schütteln bei Raumtemperatur). Nach einem weiteren Waschschritt mit PBS/Tween wurde die Platte mit einer Peroxidase-markierten kommerziellen Kaninchen anti Maus-IgG Antikörper- 25 Präparation inkubiert (z.B. Fc-spez. Fab₂-POX von Dianova GmbH, Hamburg). "Peroxidase" steht hier stellvertretend für praktisch jede beliebige Markierung des Antikörpers, z.B. mit Enzymen, Fluoreszenzmolekülen oder Lumineszenzmolekülen. Nach einem weiteren Waschschritt zur Entfernung ungebundener enzymmarkierter Antikörper wurde das farblose Peroxidase-Substrat Ortho-Phenyldiamin zugesetzt, welches durch die Peroxidase- 30 Aktivität in ein farbiges Produkt umgewandelt wird. Die Quantifizierung der

Farbbildung erfolgt in einem Mikrotiterplattenphotometer bei 490 nm gegen 405 nm (Ordinate).

Das Ergebnis des Versuchs ist in Fig. 7 dargestellt. Es zeigt, daß die 5 Farbkonzentration (angegeben als Absorption in der Ordinate) der Menge des eingesetzten pKe#83-Proteins (= des "Kalibrators", in der Abszisse dargestellt) proportional ist. Um die Funktionalität des Testsystems zu demonstrieren, wurden gleichzeitig Lysate von zwei verschiedenen Cos-Transfektanten-Ansätzen getestet, die sich in der Expression von pKe#83 10 unterscheiden. Die Cos-Zellen des einen Ansatzes wurden mit dem Vektorkonstrukt pcDNA3.1/pKe#83 (Ansatz "Cos pKe#83") und die des anderen Ansatzes mit dem pcDNA3.1 Vektor ohne Insert (Ansatz "Cos") transfiziert.

15 Zellen dieser Transfektanten-Ansätze wurden nach Standardverfahren unter Verwendung des Detergentes Triton X-100 lysiert. Diese Lysate wurden in einer 1:10-Verdünnung in PBS/Tween 20 im ELISA getestet. Lysate des "Cos pKe#83"-Transfektanten-Ansatzes zeigten eine positive Reaktion zeigen. Unter Berücksichtigung der Kalibratordaten wurde eine 20 Konzentration von ca. 120 ng pKe#83/ 10^6 Cos pKe#83-Zellen festgestellt. Bei den Lysaten der Kontroll-Transfektanten-Ansätze "Cos" konnte kein Protein pKe#83 nachgewiesen werden. Durch den Einsatz dieses Testverfahrens ist folglich eine Quantifizierung einer unbekannten Menge 25 des Proteins pKe#83 in einer Probe möglich.

Die Substanz Ortho-Phenyldiamin steht hier stellvertretend für jedes beliebige Peroxidase-Substrat, das infolge der Peroxidase-Aktivität seine Farbe nachweisbar verändert. Anstelle der hier beispielhaft verwendeten polyclonalen Antikörper können ebensogut monoklonale Antikörper, die 30 gegen das Protein pKe#83 gerichtet sind, eingesetzt werden. Anstatt des indirekten Ansatzes über einen markierten speziespezifischen anti-IgG

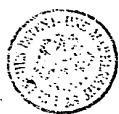


26.11.98

Antikörper kann auch die Durchführung mit einem direkt markierten anti-pKe#83-Antikörper erfolgen.

5 Beispiel 5: Beeinflussung von Keratinozyten durch pKe#83-spezifische Oligonukleotide

Antisense-Oligonukleotide werden von Zellen, auch Keratinozyten, aufgenommen (vgl.: G. Hartmann et al. 1998: *Antisense-Oligonukleotide*, 10 *Deutsches Ärzteblatt* 95, Heft 24, C1115 - C1119). Sie binden in spezifischer Weise an die in der Zelle vorliegende mRNA und hemmen deren Translation und damit die Expression des entsprechenden Proteins (vgl.: Y.-S. Lee et al. 1997, *Definition by specific antisense oligonucleotides of a role for protein kinase C α in expression of differentiation markers in normal and neoplastic mouse epidermal keratinocytes*, *Molecular Carcinogenesis* 18: 44-53). 15 Geeignete Antisense-Oligonukleotide wurden anhand der pKe#83-spezifischen Nukleotidsequenz (SEQ ID NO:1) hergestellt. Sie wurden mit geeignetem Puffermedium (sog. "Oligopuffer") auf eine Konzentration von 100 μ M eingestellt. HaCaT-Zellen wurden bei 37°C und 7 % CO₂ bis zu einer 20 Konfluenz von 70 - 80 % kultiviert. Die Zellen wurden abtrypsinisiert (10 Minuten 0,2 Gewichts-% EDTA, 0,1 Gewichts-% Trypsin, 5 - 10 Minuten) und auf eine Konzentration von 25 000 Zellen/ml eingestellt. Pro Vertiefung einer Mikrotiter-Kulturplatte (96 Vertiefungen) wurden 100 μ l Zellsuspension (entspricht 2500 Zellen) einpipettiert. Die Zellen wurden 1 Stunde unter den 25 vorgenannten Kultivierungsbedingungen inkubiert, danach erfolgte die Zugabe des Antisense-Oligonukleotids (2 μ l einer 100 μ M-Lösung) und eine weitere Inkubation von 24 - 48 Stunden. Als Negativkontrolle dienten Zellansätze, denen Oligonukleotide mit der gleichen Basenverteilung aber zufällig ausgewählter Sequenz zugegeben wurden.



26.11.98

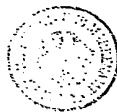
Die solcherart behandelten Zellen wurden mit Hilfe eines Mikroskops hinsichtlich phänotypischer Veränderungen untersucht. Das Ergebnis der mikroskopischen Analyse ist in **Fig. 9** dargestellt: **Fig. 9.A** zeigt HaCaT-Zellen, die mit Kontroll-Oligonukleotiden behandelt worden sind, **Fig. 9.B** zeigt HaCaT-Zellen, die mit pKe#83-spezifischen Antisense-Oligonukleotiden behandelt worden sind.

Die mikroskopischen Untersuchungen zeigten, daß in den mit Antisense-Oligonukleotiden behandelten HaCaT-Kulturen stark vergrößerte Zellen 10 auftraten (**Fig. 9.B**, Pfeile), die in den mit Kontroll-Oligonukleotiden behandelten Kulturen nicht zu finden waren. Diese großen Zellen entsprechen in ihrer Morphologie differenzierten Keratinozyten. Der Befund weist darauf hin, daß mit pKe#83-spezifischen Antisense-Oligonukleotiden behandelte Zellen eine vermehrte Tendenz zur Differenzierung aufweisen.



Ansprüche

- 1. Isoliertes Polypeptid,**
das einem natürlicherweise in humanen Keratinozyten vorkommenden und im aktivierten Zustand der Keratinozyten verstärkt exprimierten Protein gleicht oder ähnlich ist, und
das die im Sequenzprotokoll SEQ ID NO:3 oder SEQ ID NO:4 dargestellte Aminosäuresequenz oder ein durch Aminosäuresubstitution, -deletion, -insertion, -oder -inversion daraus entstandenes Allel oder Derivat dieser Aminosäuresequenz aufweist, wobei SEQ ID NO:3 und SEQ ID NO:4 Bestandteil dieses Anspruchs sind.
- 2. Isolierte Nukleinsäure,**
die ein Protein codiert, das einem natürlicherweise in humanen Keratinozyten vorkommenden und im aktivierten Zustand der Keratinozyten verstärkt exprimierten Protein gleicht oder ähnlich ist,
und die entweder die im Sequenzprotokoll SEQ ID NO:1 dargestellte Nukleotidsequenz oder die hierzu komplementäre Nukleotidsequenz oder eine Teilsequenz einer dieser beiden Nukleotidsequenzen oder eine ganz oder teilweise mit einer dieser beiden Nukleotidsequenzen hybridisierende Nukleotidsequenz aufweist, wobei SEQ ID NO:1 Bestandteil dieses Anspruchs ist.
- 3. Isolierte Nukleinsäure nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß diese Nukleinsäure aus einer natürlichen, synthetischen oder halbsynthetischen Quelle gewonnen ist.**
- 4. Isolierte Nukleinsäure nach Anspruch 2 oder 3 dadurch gekennzeichnet, daß diese Nukleinsäure eine cDNA ist.**



DEUTSCHE
FEDERAL
REPUBLIC OF GERMANY

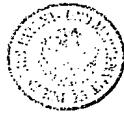
5. Isolierte Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 2 oder 3, dadurch gekennzeichnet,
daß diese Nukleinsäure ein Sense- oder Antisense-Oligonukleotid ist, das mindestens 6, vorzugsweise 8 bis 25 Nukleotide umfaßt und mit der im Sequenzprotokoll SEQ ID NO:1 dargestellten Nukleotidsequenz oder Teilsequenzen davon hybridisiert.

6. Isolierte Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 2 oder 3, dadurch gekennzeichnet,
daß diese Nukleinsäure eine Splice-Variante ist, die mit der im Sequenzprotokoll SEQ ID NO:1 dargestellten Nukleotidsequenz hybridisiert.

7. Isolierte Nukleinsäure nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet,
daß diese Nukleinsäure eine Splice-Variante ist, die die im Sequenzprotokoll SEQ ID NO:2 dargestellte Nukleotidsequenz aufweist.

8. Isoliertes Polypeptid, dadurch gekennzeichnet,
daß es eine Aminosäuresequenz aufweist, die aus einer Splice-Variante einer mRNA resultiert, welche entweder die im Sequenzprotokoll SEQ ID NO:1 dargestellte Nukleotidsequenz oder die hierzu komplementäre Nukleotidsequenz oder eine Teilsequenz einer dieser beiden Nukleotidsequenzen oder eine ganz oder teilweise mit einer dieser beiden Nukleotidsequenzen hybridisierende Nukleotidsequenz aufweist.

9. Isoliertes Polypeptid, dadurch gekennzeichnet,
daß es eine Aminosäuresequenz aufweist, die aus einer Splice-Variante einer mRNA resultiert, welche die im Sequenzprotokoll SEQ ID NO:2 dargestellte Nukleotidsequenz aufweist.



26.11.98

10. Isoliertes Polypeptid nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß es die im Sequenzprotokoll SEQ ID NO:4 dargestellte Aminosäuresequenz aufweist, wobei SEQ ID NO:4 Bestandteil dieses Anspruchs ist.
11. Rekombinantes DNS-Vektormolekül, das eine Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 2 bis 7 umfaßt, und das die Fähigkeit zur Expression eines in humanen Keratinozyten vorkommenden und in aktivierten Keratinozyten verstärkt exprimierten Proteins, insbesondere des Proteins pKe#83, in einer prokaryontischen oder eukaryontischen Zelle aufweist.
12. Rekombinantes DNS-Vektormolekül nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, daß das Vektormolekül ein Abkömmling des Plasmids pUEX-1 oder des Plasmids pGEX-2T oder des Plasmids pcDNA3.1 ist.
13. Rekombinantes DNS-Vektormolekül nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, daß das Vektormolekül ein Konstrukt gemäß Vektorprotokoll in Fig. 2 oder gemäß Vektorprotokoll in Fig. 3 ist, wobei dieses Vektorprotokolle Fig.2 und Fig.3 Bestandteile dieses Anspruchs sind.
14. Transformierte Wirtszelle, die eine Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 2 bis 7 enthält, welche mit einem aktivierbaren Promotor gekoppelt ist, der in der Wirtszelle natürlicherweise oder als Folgen einer Rekombination enthalten ist, und die die Fähigkeit zur Expression eines in humanen Keratinozyten vorkommenden und in aktivierten Keratinozyten verstärkt exprimierten Proteins, insbesondere des Proteins pKe#83, aufweist.

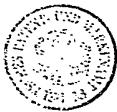


15. Transformierte Wirtszelle nach Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, daß der Promotor der Zytokeratin-14-Promotor und die Wirtszelle ein Keratinozyt ist, oder daß der Promotor der CMV-Promotor und die Wirtszelle eine Cos-Zelle ist.
16. Verwendung einer Nukleinsäure nach Anspruch 2 oder eines Vektormoleküls nach einem der Ansprüche 11 bis-13 zur Herstellung transgener Säugetiere, insbesondere Mäuse oder Ratten.
17. Verwendung eines Polypeptids nach Anspruch 1 oder Anspruch 8 zur Herstellung eines Antikörpers gegen dieses Polypeptid und/oder damit verwandter Proteine.
18. Verwendung nach Anspruch 17, dadurch gekennzeichnet, daß der Antikörper zur diagnostischen und/oder therapeutischen Behandlung von insbesondere dermatologischen Erkrankungen oder zur kosmetischen Behandlung insbesondere der Epidermis eingesetzt wird.
19. Antikörper, der spezifisch mit einem Polypeptid gemäß Anspruch 1 oder Anspruch 8 reagiert.
20. Verwendung eines Antikörpers nach Anspruch 19 zur diagnostischen und/oder therapeutischen Behandlung von dermatologischen Erkrankungen oder zur kosmetischen Behandlung der Epidermis.



26.11.98

21. Reagenz zum indirekten Nachweis eines in humanen Keratinozyten vorkommenden und in aktivierten Keratinozyten verstärkt exprimierten Proteins, insbesondere des Proteins pKe#83, dadurch gekennzeichnet, daß das Reagenz unter Verwendung wenigstens einer Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 2 bis 6 und/oder eines Polypeptids gemäß Anspruch 1 oder Anspruch 8 hergestellt ist.
22. Verwendung eines Sense- oder Antisense-Oligonukleotids nach Anspruch 5 oder Anspruch 6 zur diagnostischen und/oder therapeutischen Behandlung von insbesondere dermatologischen Erkrankungen oder zur kosmetischen Behandlung insbesondere der Epidermis.
23. Verwendung eines Polypeptids nach Anspruch 1 oder Anspruch 8 oder einer Nukleinsäure nach Anspruch 2 zur Identifizierung von medizinisch, kosmetisch oder pharmakologisch einsetzbaren Substanzen, die an das Polypeptid bzw. die Nukleinsäure binden und dadurch dessen/deren Funktion und/oder Expression beeinflussen, insbesondere als Inhibitoren oder Aktivatoren wirken.



30.11.98

SEQUENZPROTOKOLLE

ALLGEMEINE ANGABEN:

ANMELDER:

NAME: Dr. Michael Kramer
STRASSE: Bergstraße 85
ORT: Pfungstadt
BUNDESLAND: Hessen
LAND: Deutschland
POSTLEITZAHL: 64319

VERTRETER:

NAME: Dr. Ulrike Rudolph
STRASSE: In der Schanz 10
ORT: Schriesheim
BUNDESLAND: Baden-Württemberg
LAND: Deutschland
POSTLEITZAHL: 69198
VERTRETERNUMMER: 246 263
AKTENZEICHEN: km-3

TELEKOMMUNIKATION:

TELEFON: 06203-61348
TELEFAX: 06203-64196

BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG:

Regulatorisches Protein pKe#83 aus humanen Keratinozyten

ANZAHL DER SEQUENZEN:

4

COMPUTERLESBARE FASSUNG:

DATENTRÄGER: Diskette
COMPUTER: IBM-kompatibler PC
BETRIEBSSYSTEM: MS-DOS
SOFTWARE: Microsoft WORD für Windows 6.0

ANGABEN ZU SEQ ID-NO:1:

SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

LÄNGE:

ART:

TOPOLOGIE:

2667 Basenpaare

Desoxyribonukleinsäure

linear

ART DES MOLEKÜLS:

cDNA

HYPOTHETISCH:

nein

ANTI-SENSE:

nein

URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

ORGANISMUS:

STAMM:

ENTWICKLUNGSSSTADIUM:

ZELLTYP:

Homo sapiens

kaukasisch

adult

epidermaler Keratinozyt

UNMITTELBARE HERKUNFT:

cDNA aus Keratinozyten

MERKMALE:

NAME/Schlüssel:

kodierende Sequenz für
regulatorisches Protein pKE#83
aus humanen Keratinozyten

LAGE:

ERMITTlungSMETHODE:

von 1 bis 2667

cDNA-Sequenzierung

SEQ ID NO: 1

1 GTTTGTTAG GCAAAAGAG ACTATTGAAA GCTGAGACTT TAGAATTGAG
 51 TGACTTATAT GTTAGTGATA AGAAGAAGGA TATGTCTCCA CCCTTTATTT
 101 GTGAGGAGAC AGATGAACAA AAGCTCAA CTCTAGACAT CGGTAGTAAC
 151 TTGGAGAAAG AAAAATTAGA GAATTCCAGA TCCTTACAAT GCAGATCAGA
 201 TCCAGAACATCT CCTATCAAAA AAACAAGTTT ATCTCCTACT TCTAAACTTG
 251 GATACTCATAGTAGAGAT CTAGACCTTG CTAAGAAAAA ACATGCTTCC
 301 CTGAGGCAGA CGGAGTCTGA TCCAGATGCT GATAGAACCA CTTTAAATCA
 351 TGCAGATCAT TCATCAAAA TAGTCCAGCA TCGATTGTTA TCTAGACAAG
 401 AAGAACTAA GGAAAGAGCA AGAGTTCTGC TTGAGCAAGC AAGAGAGAT
 451 GCACCTTAA AGGCGGGGAA TAAGCAAAAT ACCAACACAG CCACCCATT
 501 CTGCAACAGG CAGCTAAGTG ATCAGCAAGA TGAAGAGCGA CGTCGGCAGC
 551 TGAGAGAGAG AGCTCGTCAG CTAATAGCAG AAGCTCGATC TGGAGTGAAG
 601 ATGTCAGAAC TTCCCAGCTA TGGTGAATG GCTGAGAAA AGTTGAAAGA
 651 AAGGTCAAAG GCATCTGGAG ATGAAAATGA TAATATTGAG ATAGATACTA
 701 ACGAGGAGAT CCCTGAAGGC TTTGTTGTTAG GAGGTGGAGA TGAACCTACT
 751 AACTTAGAAA ATGACCTTGA TACTCCCAGA CAAAACAGTA AGTTGGTGA
 801 CTTGAAGCTG AAGAAGCTCC TAGAAGTICA GCCACAGGTG GCAAATTAC
 851 CCTCCAGTGC TGCCCCAGAAA GCTGTAACCTG AGAGCTCAGA GCAGGACATG
 901 AAAAGTGGCA CAGAAGATCT CGGAGCTGAA CGATTACAAA AAACAACAGA
 951 ACGTTTAAAG AATCCCTGTT TGTTCAAGCA AGATCTACA GTCAAGAAAA
 1001 CTCAACTTCA GTCTTCAGC CAATATATG AGAATAGACC AGAGATGAAA
 1051 AGGCAGAGAT CAATACAGGA AGATACAAAG AAAGGAAATG AGGAGAAGGC
 1101 AGCGATAACT GAAACTCAGA GGAAGCCATC AGAAGATGAA GTGCTTAATA
 1151 AAGGGTTCAA AGACACCAGT CAGTATGTTAG TAGGAGAATT GCCAGCACTA
 1201 GAGAATGAGC AAAAGCAAAT TGACACCCGT GCCCGCCTGG TGGAGAAGCG
 1251 CCTTCGCTAT CTCATGGACA CAGGAAGGAA CACAGAAGAA GAAGAACGTA
 1301 TGATGCAGGA ATGGTTTATG TTAGTTAATA AGAAAATGC CTTAATAAGG
 1351 AGAATGAATC AGCTCTCTCT TCTGGAAAAA GAACATGATT TGAACGACG
 1401 GTATGAGCTG CTGAAACGGG AATTGAGGGC AATGCTAGCC ATTGAAGACT
 1451 GGCAAGAGAC CGAGGCCAG CGACGACCG AACAGCTTCT GCTAGATGAG
 1501 CTGGTGGCCC TGTTGAACAA CGCGATGCG CTCGTCAAGGG ACCTGGACGC
 1551 GCAGGAGAAG CAGGCCGAAG AAGAAGATGA GCATTGGAG CGAACTCTGG
 1601 AGCAAAACAA AGGCAAGATG CCCAAGAAAG AGGAGAAATG TGTTCTTCAG
 1651 TAGCCATCAG ATCAGAAAGA ATCTCTCCA ACATTTAGA GTCTGCTTC
 1701 CCAAACCAGA AAAAGTCAGA CTCATTGTTAG ATTTAAAATC TTTAACATTT
 1751 TGTTGGCTG GATTGACTA CTTTACCTCT ACTTTACAC CACCACCCIT
 1801 TTCCCTCCCTC CTTTCAAAAT AATATACAGA ACTCCAAAAT AGCTTCATTT
 1851 AAGGATTTTG TTGTGAGTT ACAATTCTCT TGAAATCTG TGAAATAGAT
 1901 TTGACACAGAC ACCTTGTGAG TGATTGGTAT TGGAGGTGTT CAAGAAACTG
 1951 TTGCAAAAG AACAAAACAA CTTCCCTCGT TATTTCCTCT CATTTCITGA
 2001 TGAGAGGAAA ATTTGAAACAA TTATTCTTGT TGTTGTTGGT AATAGCATAA
 2051 TGACAGTGGG AGGGTACAA GGGGATAAGA AAAATGTCT GATTTTTTC
 2101 CGGTCTGTC ACATGTAACA CTTACTCTGT TACCTAAATT TTATAGTTAG
 2151 ATCATATCCTA ATCTACTTAT TAAACTGTGT TCTATTCTAC AGTGGAGTTT
 2201 TTCTGCAGTG GTTGCCTTC ACTGTAAGGA TAATGGAGTT CCTCTCCCT
 2251 GCTTCCCTCA GAGGATGGTC CTTAACATA GCCAGAAACA AGCCCTGTGG
 2301 TTGAGGTG AGCTGTGAGG ATGGGACTAA TTGATATGCA CCAGTTTACA
 2351 AAGACAGTCT TATCATCCGA GAATACACCA TCTTTTCTC TGGATAATTA
 2401 TTCTTACAT CATGCTTGTAT CTCACATTT TGTTGGGTTT CAACATGGC
 2451 TCACGAATGC TGTTAATATT TATTCTGTAT TGATAAAAAG TCTGTCTTC
 2501 CACTACAAGT AAATCCCCA TTAAATATT TCTTCTTTAG CATAGCACTG
 2551 TCATTTCAGTG TGAAAATGGT TATGTTTATT TATTACAATA CTGAGTCATA
 2601 TATAAATTTT CAATAAAAGC AGAAACTTTC TTACCTTAAA AAAAAAAA
 2651 AAAAAAAAAA AAAAAAAA



26.11.98

ANGABEN ZU SEQ ID-NO:2

SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

LÄNGE:

ART:

TOPOLOGIE:

2547 Basenpaare
Desoxyribonukleinsäure
linear

ART DES MOLEKÜLS:

cDNA

HYPOTHETISCH:

nein

ANTI-SENSE:

nein

URSPRUNGLICHE HERKUNFT:

ORGANISMUS:

Homo sapiens

STAMM:

kaukasisch

ENTWICKLUNGSSTADIUM:

adult

ZELLTYP:

epidermaler Keratinozyt

UNMITTELBARE HERKUNFT:

cDNA aus Keratinozyten

MERKMALE:

NAME/Schlüssel:

Splice-Variante einer kodierende Sequenz
für das regulatorische Protein pKe#83
aus humanen Keratinozyten

LAGE:

von 1 bis 2547

ERMITTlungSMETHODE:

cDNA-Sequenzierung

SEQ ID NO: 2

1 GTTTGTTAG GCAAAAGAG ACTATTGAAA GCTGAGACTT TAGAATTGAG
 51 TGACTTATAT GTTAGTGATA AGAAGAAGGA TATGTCTCCA CCCTTTATTT
 101 GTGAGGAGAC AGATGAACAA AAGCTTCAA CTCTAGACAT CGGTAGTAAC
 151 TTGGAGAAAG AAAAATTAGA GAATTCCAGA TCCTTAGAAT GCAGATCAGA
 201 TCCAGAACAT CCTATCAAAA AAACAAGTTT ATCTCCTACT TCTAAACTTG
 251 GATACTCATA TAGTAGAGAT CTAGACCTG CTAAGAAAAA ACATGCTICC
 301 CTGAGGCAGA CGGAGCTGTA TCCAGATGCT GATAGAACCA CTTAAATCA
 351 TGCAGATCAT TCATCAAAA TAGTCCAGCA TCGATTGTTA TCTAGACAAG
 401 AAGAACTTAA GGAAAGAGCA AGAGTTCTGC TTGAGCAAGC AAGAAGAGAT
 451 GCAGCCTTAA AGGCCGGAA TAAGCACAAT ACCAACACAG CCACCCCATT
 501 CTGCAACAGG CAGCTAAGTG ATCAGCAAGA TGAAGAGCGA CGTCGGCAGC
 551 TGAGAGAGAG AGCTCGTCAG CTAATAGCGAG AAGCTCGATC TGGAGTGAAG
 601 ATGTCAGAAC TTCCCACCTA TGCTGAAATG GCTGCAGAAA AGTTGAAAGA
 651 AACGTCAAAG CAAAACAGTA AGTTGGTGA CTTGAAGCTG AAGAAGCTCC
 701 TAGAAGTTCA GCCACAGGTG GCAAATTCAAC CCTCCAGTGC TGCCCCAGAAA
 751 GCTGTAACTG AGAGCTCAGA GCAGGACATG AAAAGTGGCA CAGAAGATCT
 801 CCGGACTGAA CGATTACAAA AAACAACAGA ACGTTTTAGA AATCCTGTTG
 851 TGTTCAAGCA AGATCTACAGA GTCAGAAAAA CTCAACTCA GTCTTTCAAGC
 901 CAATATATTG AGAATAGACC AGAGATGAAA AGGCAGAGAT CAATACAGGA
 951 AGATACAAAG AAAGGAAATG AGGAGAACGG AGCGATAACT GAAACTCAGA
 1001 GGAAGCCATC AGAACATGAA GTGCTTAATA AAGGGTTCAA AGACACCAAGT
 1051 CAGTATGTAG TAGGAGAATT GGCAGCACTA GAGAATGAGC AAAAGCAAAT
 1101 TGACACCCGT GCCGCGCTGG TGGAGAACCG CCTTCGCTAT CTCATGGACA
 1151 CAGGAAGGAA CACAGAAGAA GAAGAAGCTA TGATGCAGGA ATGGTTTATG
 1201 TTAGTTAATA AGAAAAATGC CTTAATAAGG AGAAATGAATC AGCTCTCT
 1251 TCTGGAAAAA GAACATGATT TAGAACGAGC GTATGAGCTG CTGAACCGGG
 1301 AATTGAGGGC AATGCTAGCC ATTGAAGACT GGCAGAACAGC CGAGGCCAG
 1351 AAGCGACCGC AACAGCTTCT GCTAGATGAG CTGGTGGCCC TGGTGAACAA
 1401 GCGCGATGCG CTCGTCAGGG ACCTGGACGC GCAGGAGAAG CAGGCCAG
 1451 AAGAAGATGCA GCATTGGAG CGAACCTCTGG AGCCAAAACAA AGGCAAGATG
 1501 GCAAGAAAAG AGGAGAAATG TTGTTCTTCAG TAGGCATCAG ATCAGAAAAG
 1551 ATCTCTCCCA ACATTTTAA GTCTTGCTTC CCAAACCAAGA AAAAGTCAGA
 1601 CTCATTTGTTG ATTTAAAATCT TTTAACATTT TGTTGGCTG GATTGTACTA
 1651 CTTTACCTCT ACTTTACCAAC CACCACCCCTT TTCCTCCCTC CTTTCCAAAT
 1701 AATATACAGA ACTCCAAAAT AGCTTCATTT AAGGATTTTT TTGTGAGTTA
 1751 ACAATTTCCT TGAAATCCTG TGAAATAGAT TTGCACAGAC ACCTTGTGAG
 1801 TGATTGGTAT TGGAGGTGTT CAAGAAACTG TTGAAAAAAG AACAAAACA
 1851 CTCCCTCGT TATTTCTCT CATTTTTGTG TGAGAGGAAA ATTTGAAACA
 1901 TTATTCTGT TGTTGTTGGT AATAGCATAA TGACAGTGGG AGGGGTACAA
 1951 GGGGATAAGA AAAATGTCAAT GATTTTTTC CGGTCTCTCC ACATGTAACA
 2001 CTTACTCTGT TACCTAAATT TTATAGTTAG ATCATATCCA ATCTACTTAT
 2051 TAAACTGTGT TCTATTACCG AGTGGAGTT TTCTGCAGTG GTTGCCTTTC
 2101 ACTGTAAGGA TAATGGAGTT CCTCTCCTCT GCTTCCCTCA GAGGATGGTC
 2151 CTTAACATA GCCAGAAACA AGCCCTGTGG TTGAAGGTG AGCTGTGAGG
 2201 ATGGGACTAA TTGATATGCA CCAGTTTACA AAGACAGTCT TATCATCCGA
 2251 GAATACACCA TCTTTTCTC TGGATAATTAA TTTCTTACAT CATGCTGTAT
 2301 TCCTACATTG TGTTGGGTTT CAACATTGGC TCACGAATGC TGTTAATATT
 2351 TATTCTGTAT TGATAAAAAG TCTGTCTTGC CACTACAAGT AAATCCCCCA
 2401 TTAAATATT TCTTCTTGTG CATAGCACTG TCATTTTTTG TGAAAATGGT
 2451 TATGTTTATT TATTACAATA CTGAGTCATA TATAAATTTT CAATAAAAAGC
 2501 AGAAACTTTC TTACCTTAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAA



26.11.98

ANGABEN ZU SEQ ID-NO:3:**SEQUENZCHARAKTERISTIKA:**

LÄNGE:

523 Aminosäuren
Aminosäuresequenz

ART:

Protein

ART DES MOLEKÜLS:**URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:**

ORGANISMUS:

Homo sapiens

STAMM:

kaukasisch

ENTWICKLUNGSSTADIUM:

adult

ZELLYP:

epidermaler Keratinozyt

UNMITTELBARE HERKUNFT:

abgeleitet aus cDNA-Sequenz

MERKMALE:**NAME/SCHLÜSSEL:**kodierende Sequenz für das
regulatorische Protein pK_E#83
aus humanen Keratinozyten**LAGE:**

von 1 bis 523

ERMITTlungSMETHODE:

Ableitung aus cDNA-Sequenz

SONSTIGE ANGABEN:umfaßt eine Prenyl-Gruppen-Bindungs-
stelle ("CAAX-Box"), neun Proteinkinase-
phosphorylierungsmotive, 15 Casein-
kinasephosphorylierungsmotive und zwei
Tyrosinkinasephosphorylierungsmotive

SEQ ID No: 3

1 MSPPFICEET DEQKLQTLDI GSNLEKEKLE NSRSLECRSD PESPIKKTSL
51 SPTSKLGYSY SRDLDLAKKK HASLRQTESD PDADRTTLNH ADHSSKIVQH
101 RLLSRQEELK ERARVLEQA RRDAALKAGN KHNTNTATPF CNRQLSDQOD
151 EERRRQLRER ARQLIAEARS GVKMSELPSTY GEMAAEKLKE RSKASGDEND
201 NIEIDTNEEI PEGFVVGGGD ELTNLENDLD TPEQNSKLVD LKLKKLLEVQ
251 PQVANSPSSA AQKAVTESSE QDMKSGTEDL RTERLQKTTE RFRNPVVFSK
301 DSTVRKTQLQ SFSQYIENRP EMKRQRSIQE DTKKGNEEKA AITETQRKPS
351 EDEVLNKGFK DTSQYVVGEL AALENEQKQI DTRAALVEKR LRYLMDTGRN
401 TEEEAMMQE WFMLVNKKNA LIRRMINQLSL LEKEHDLERR YELLNRELRA
451 MLAIEDWQKT EAQKRREQLL LDELVALVNK RDALVRDLDA QEKAEEEDZ
501 HLERTLEQNK GKMAKKEEKC VLO*



26.11.98

ANGABEN ZU SEQ ID-NÖ:4:

SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

LÄNGE:

ART:

482 Aminosäuren
Aminosäuresequenz

ART DES MOLEKÜLS:

Protein

URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

ORGANISMUS:

STAMM:

ENTWICKLUNGSSSTADIUM:

ZELLTYP:

Homo sapiens
kaukasisch
adult
epidermaler Keratinozyt

UNMITTELBARE HERKUNFT:

abgeleitet aus cDNA-Sequenz

MERKMALE:

NAME/SCHLÜSSEL:

kodierende Sequenz für das
regulatorische Protein pKe#83
aus humanen Keratinozyten

LAGE:

ERMITTlungSMETHODE:

SONSTIGE ANGABEN:

von 1 bis 482

Ableitung aus cDNA-Sequenz
umfaßt eine Prenyl-Gruppen-Bindungs-
stelle ("CAAX-Box"), neun Proteinkinase-
phosphorylierungsmotive, 15 Casein-
kinasephosphorylierungsmotive und zwei
Tyrosinkinasephosphorylierungsmotive

SEQ ID No: 4

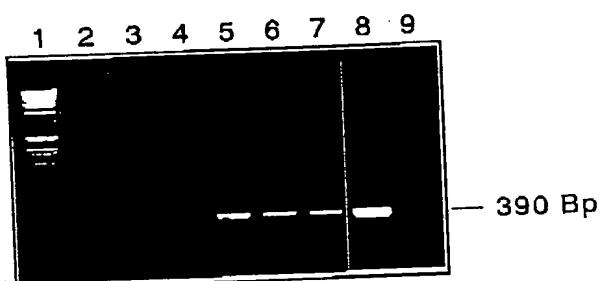


1 MSPPFICEET DEQKLQTLDI GSNLEKEKLE NSRSLECRSD PESPIKKTS
51 SPTSKLGYSY SRDLDLAKKK HASLROTESD PDADRTTLNH ADHSSKIVQH
101 RLLSRQEELK ERARVILLEQA RRDAALKAGN KHNTNTATPF CNRQLSDQQD
151 EERRRQLRER ARQLIAEARS GVKMSELPsy GEMAAEKLKE EQNSKLVDLK
201 LKKLLEVQPQ VANSPSSAAQ KAVTESSEQD MKSGTEDLRT ERLQKTTERF
251 RNPVVFSKDS TVRKTQLQSF SQYIENRPEM KRQRSIQEDT KKGNEEKAAI
301 TETQRKPSED EVLNKGFKDT SQYVVGELAA LENEOKQIDT RAALVEKRLR
351 YLMDTGRNTE EEEAMMQEWF MLVNKNALI RRMNQLSLLE KEHDLERRYE
401 LLNRELRAML AIEDWQKTEA QKRREQLLD ELVALVNKRD ALVRDLDQAQE
451 KQAEEDDEHL ERTLEQNKGK MAKKEEKCVL Q*

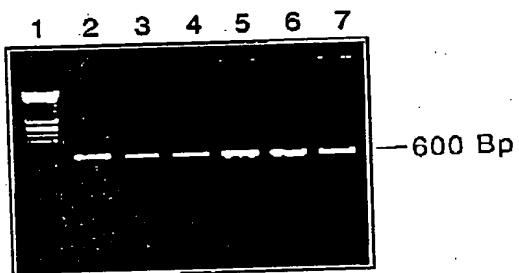


26.11.98

A



B



C

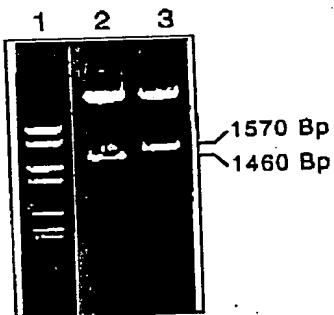


Fig.1



30 1 30 30 30 30 30 30

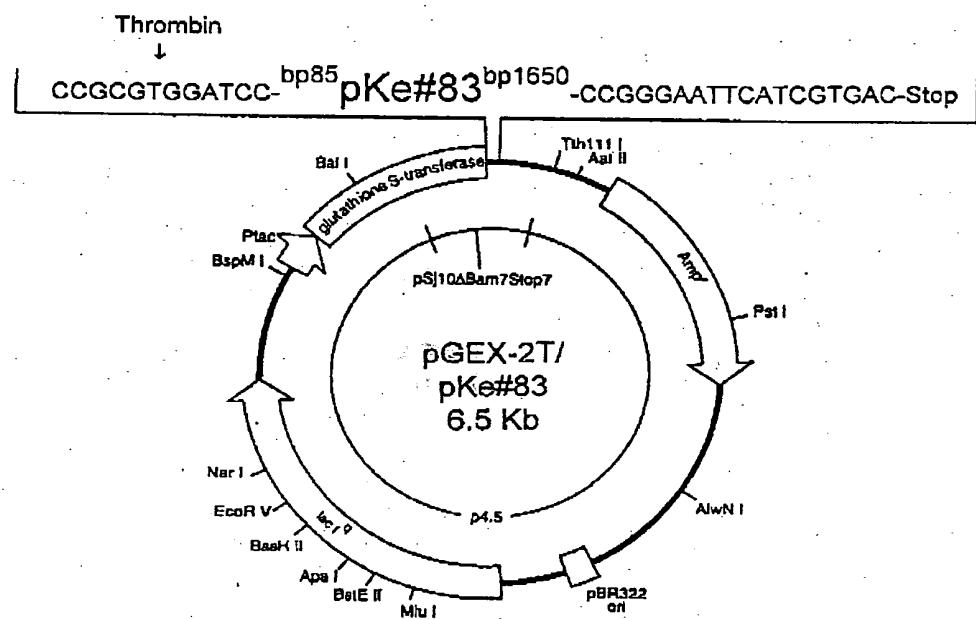


Fig.2

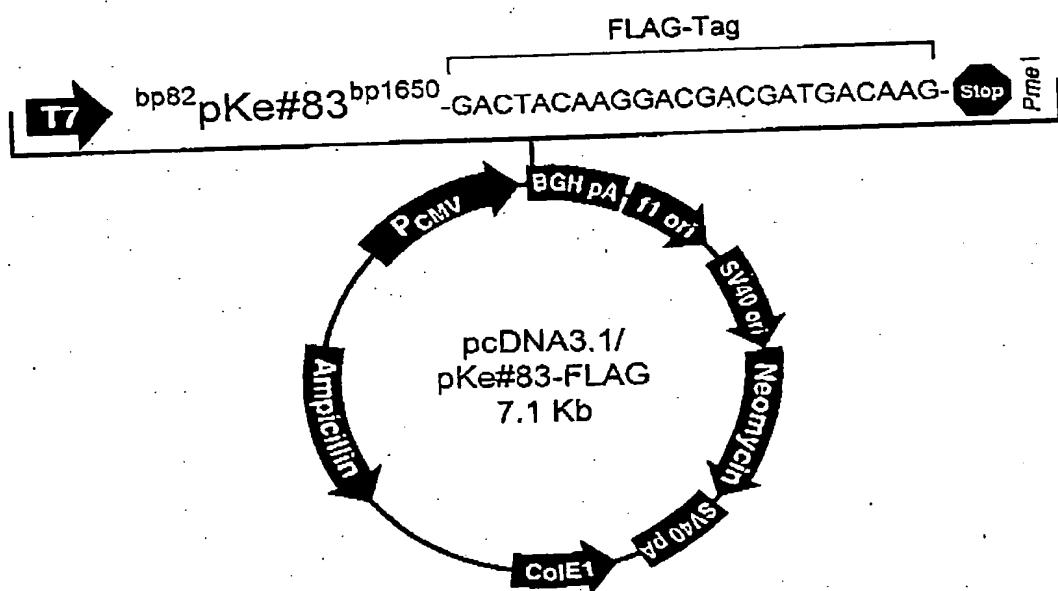


Fig.3



26.11.98

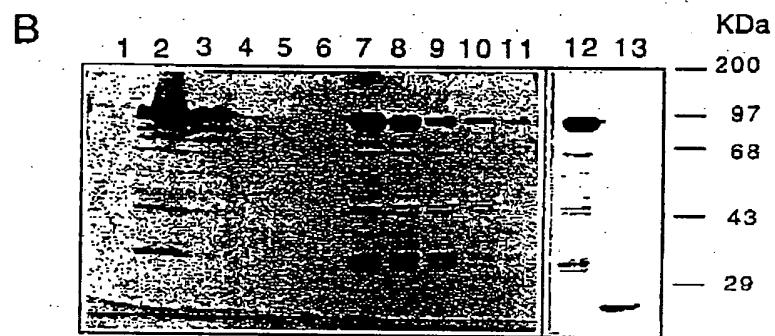
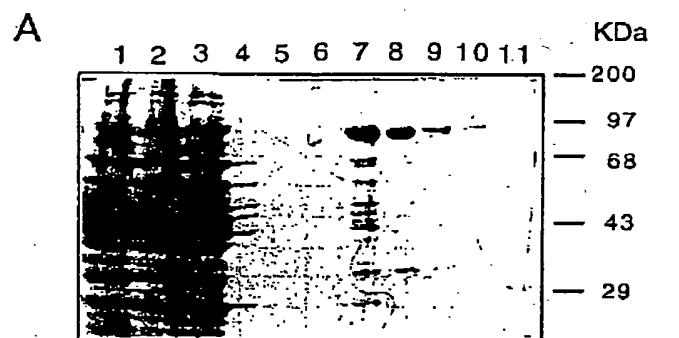


Fig.4

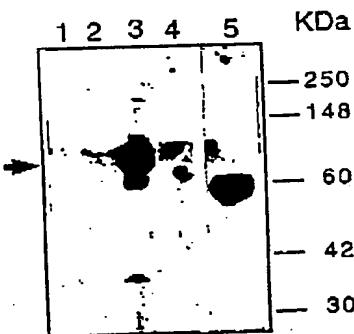


Fig.5

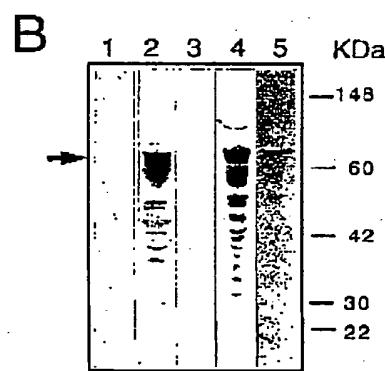
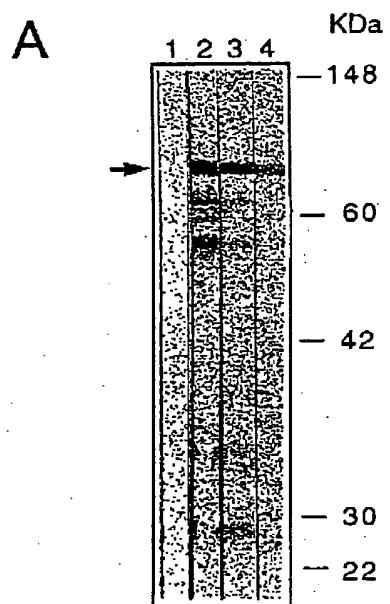


Fig.6

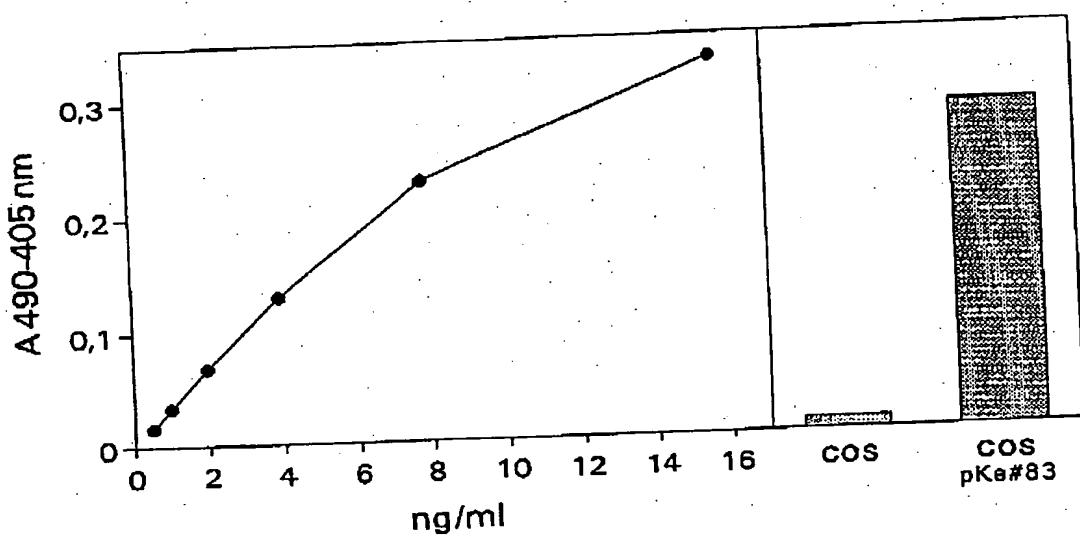


Fig.7

26/11 '98 21:16 FAX +49 6203 64196

PA Dr. Rudolph → DPA MÜNCHEN

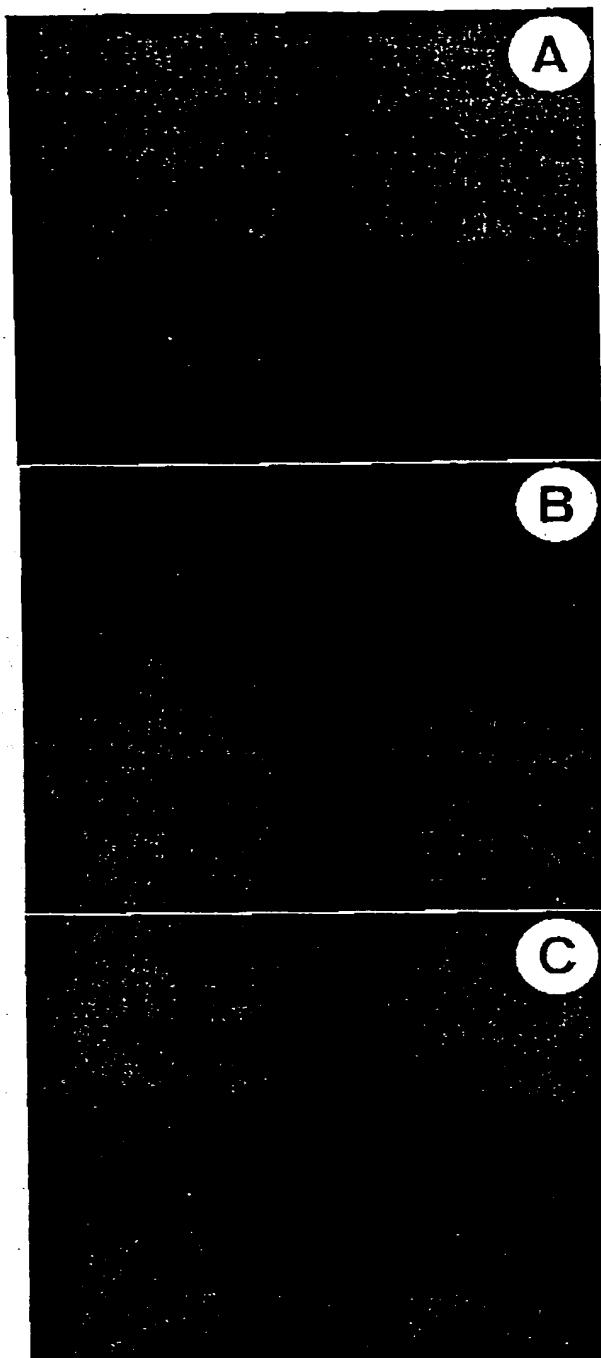


Fig.8

28/11 '98 21:16 FAX +49 6203 1196

PA Dr. Rudolph → DPA MÜNCHEN

4050

51

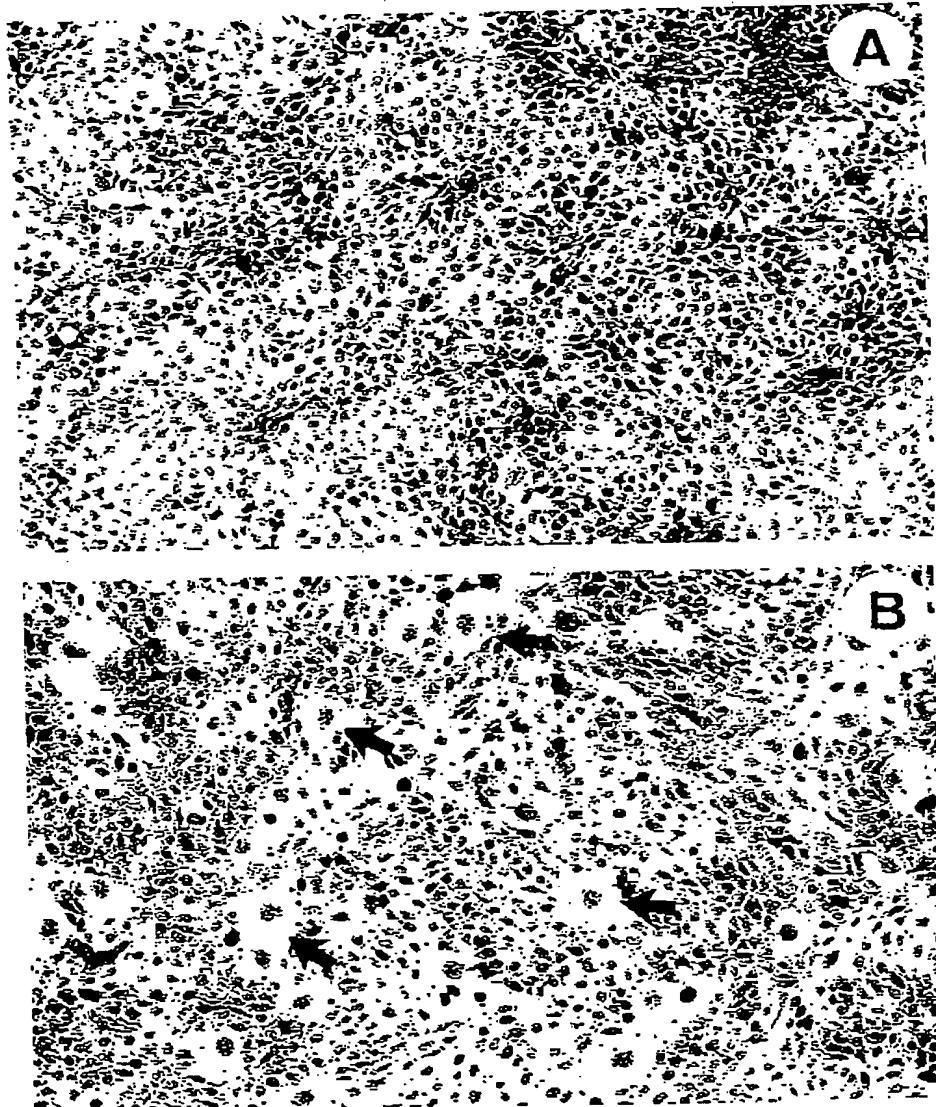
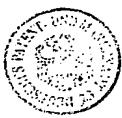


Fig.9

THIS PAGE BLANK (USPTO)